

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
  - TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
  - FADED TEXT
  - ILLEGIBLE TEXT
  - SKEWED/SLANTED IMAGES
  - COLORED PHOTOS
  - BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- 
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**INPI**  
INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

PCT/FR 99/01990

REC'D 27 AUG 1999

WIPO

PCT

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 24 JUIN 1999

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**ROLAND  
MARTIN**

MARTIN PLANCHÉ

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
75000 PARIS Cedex 08  
Téléphone 01 55 30 93 00  
Télécopie 01 42 95 59 30

ETABLISSEMENT PUBLIC NATIONAL - CRÉÉ PAR LA LOI N° 514 DU 15 AVRIL 1993

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales.

Réservé à l'INPI DATE DE REMISE DES PIÈCES <b>19. AOUT 1998</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL <b>98 10533</b> DÉPARTEMENT DE DÉPÔT <b>75</b> DATE DE DÉPÔT <b>19 AOUT 1998</b>		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b> RHONE-POULENC RORER S.A. Direction Brevets 20 avenue Raymond Aron 92165 ANTONY CEDEX	
<b>2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle</b> <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat		n° du pouvoir permanent <b>01.01.94</b> références du correspondant <b>ST 98027</b> téléphone <b>01 55 71 71 57</b> date	
Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Titre de l'invention (200 caractères maximum) <p style="text-align: center;"><b>DISPOSITIF DE MESURE RAPIDE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE</b></p>			
<b>3 DEMANDEUR (S)</b> n° SIREN Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination <p style="text-align: center;"><b>RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE</b></p>		code APE-NAF Forme juridique	
Nationalité (s) <b>Française</b> Adresse (s) complète (s) <p style="text-align: center;"><b>42 avenue Aristide BRIAND 92160 ANTONY</b></p>		Pays <p style="text-align: center;"><b>FRANCE</b></p>	
En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/>			
<b>4 INVENTEUR (S)</b> Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
<b>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b> <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission			
<b>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</b> pays d'origine      numéro      date de dépôt      nature de la demande			
<b>7 DIVISIONS</b> antérieures à la présente demande n°      date      n°      date			
<b>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (nom et fonction) <p style="text-align: center;"><b>RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE Un Fondé de Pouvoir</b></p> <p style="text-align: center;"><b>LE PENNEC Magali</b></p>		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION      SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI	

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30 ST 98027

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 10533 du 19 Août 1998

TITRE DE L'INVENTION : DISPOSITIF DE MESURE RAPIDE DE L'ACTIVITÉ  
ENZYMATIQUE

LE(S) SOUSSIGNÉ(S) RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE  
42 Avenue Aristide Briand  
92160 ANTONY

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

ROBERTS Neil - 15 Newlyn Drive, Bredbury, Stockport, Cheshire  
SK6 1EF, GRANDE BRETAGNE

MOORES Janet - 15 Leyfield Avenue, Romiley, Stockport, Cheshire  
SK6 4AP, GRANDE BRETAGNE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

ANTONY, 1<sup>er</sup> 16 Novembre 1998



M. LE PENNEC

## DISPOSITIF DE MESURE RAPIDE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

La présente invention concerne un dispositif de mesure rapide d'une activité enzymatique dans un aliment solide comprenant (i) un récipient destiné à contenir l'échantillon à tester, (ii) un réactif propre à l'enzyme dont on veut mesurer l'activité et  
5 (iii) un tampon permettant la mise en solution de l'enzyme.

---

L'aliment est de préférence un aliment solide et non traité préalablement à la mesure.

Les aliments destinés aux animaux d'élevage sont usuellement additionnés d'enzymes dont le rôle est principalement une meilleure digestibilité de la ration  
10 alimentaire. Ces enzymes sont le plus souvent pulvérisées sous forme liquide sur les aliments, tel que notamment décrit dans le brevet EP 0789291. Les enzymes peuvent aussi être additionnées sous forme de poudre dans l'aliment.

Deux problèmes se posent alors, le premier est de vérifier l'uniformité de la répartition des enzymes ajoutées à l'aliment, le second est d'évaluer de façon rapide et  
15 facile l'activité de la ou des enzymes ajoutées aux aliments. Ces problèmes sont en particulier soulevés par les fabricants d'aliments et les éleveurs voulant vérifier la qualité des aliments qu'ils veulent donner à leurs animaux. Jusqu'à présent, l'activité enzymatique pouvait être mesurée en laboratoire, ce qui entraînaient des contraintes en terme de logistique et de délais, ces contraintes étaient gênantes en cas de besoin  
20 d'un résultat immédiat.

La présente invention répond à ce problème en proposant un dispositif de mesure de l'activité enzymatique de n'importe quel aliment enrichi en enzyme destiné à l'alimentation animale. Ce dispositif, dont la mesure repose sur une réaction

colorimétrique, permet à la fois une mesure qualitative de l'activité enzymatique de l'échantillon testé et une mesure semi-quantitative de cet échantillon.

La figure 1 représente un moyen de mise en oeuvre de l'invention sous forme d'un dispositif de mesure de l'activité enzymatique se présentant sous la forme d'une  
5 colonne..

---

La description suivante peut se lire au regard de la figure ci-dessus mentionnée.

Le dispositif objet de la présente invention comprend un récipient destiné à contenir l'échantillon à tester, un réactif propre à l'enzyme dont on veut mesurer  
10 l'activité et un tampon permettant la mise en solution de ladite enzyme.

Le récipient de ce dispositif peut être, de façon non limitative, une colonne (figure 1) composée d'une partie inférieure étroite graduée (11) et d'une partie supérieure large en forme d'entonnoir (12) facilitant l'introduction des différents réactifs dans la colonne ainsi que leur mélange lors de l'agitation. La colonne peut  
15 aussi être munie d'un système d'ouverture et de fermeture étanche (13) telle qu'un bouchon relié au corps de la colonne par une languette (131).

Le récipient peut aussi être constitué d'un tube à usage unique (figure 2).

Le récipient peut être en matière synthétique telle qu'un plastique à usage unique.

20 De façon préférée, le récipient peut comporter une excroissance sécable (14) à sa base permettant l'écoulement de la partie liquide de son contenu. L'excroissance est avantageusement surmontée d'un étranglement (141) retenant les morceaux d'aliments solides.



La mesure de l'activité enzymatique est basée sur la réaction de coloration de la méthode Azo. Le principe de la réaction de coloration de la méthode Azo repose sur l'hydrolyse enzymatique d'un substrat caractéristique d'une enzyme lié à un chromophore. La réaction produit des oligomères solubles qui colorent en bleu le milieu. L'absorbance du milieu peut être mesurée à 590 nm.

---

Le réactif utilisé dans le dispositif est le substrat de la réaction catalysée par l'enzyme lié à un chromophore. Ainsi, la réaction d'hydrolyse enzymatique libère le substrat chromophore.

Le dispositif comprend également un tampon permettant la mise en solution des enzymes qui ont été pulvérisées sur l'aliment ainsi que le maintien des enzymes à leur pH optimum.

On peut citer, à titre d'exemple et de façon non restrictive, le dispositif de mise en évidence de l'activité des xylanases.

Pour la mesure de l'activité des xylanases, le réactif utilisé est l'"Oat spelt Xylan Remazol Brilliant Blue R" ou le "Xylazyme AX" (vendus par la société Megazyme et constitué d'araboxylane d'avoine ou de blé lié à un colorant).

Le tampon utilisé est choisi parmi les tampons acide acétique/acétate de sodium; chlorhydrate de glycine/glycine; acide aconitique/hydroxyde de sodium; acide formique/formate de sodium.

On peut encore citer le dispositif de mise en évidence de l'activité des  $\beta$ -glucanases qui repose également sur la réaction de coloration de la méthode Azo.

Parmi les substrats utilisables on peut citer le 1,3 : 1,4- $\beta$ -D-glucan avec Remazol Brilliant Blue R et le Beta-Gluczyme vendu par la société Megazyme et constitué de b $\acute$ ta glucane associ $\acute$ e  $\grave$ a de l'Azurine.

Le tampon utilis $\acute$  est choisi parmi les tampons acide ac $\acute$ tique/ac $\acute$ tate de sodium; chlorhydrate de glycine/glycine; acide aconitique/hydroxyde de sodium; acide formique/formate de sodium.

---

Pour la mesure de l'activit $\acute$  de la cellulase, le substrat utilis $\acute$  est sous forme de tablettes Cellazyme (commercialis $\acute$ e par la soci $\acute$ t $\acute$  Megazyme). Ces tablettes sont constitu $\acute$ es de substrats  $\grave$ a base de cellulose et ou de cellulose et de xyloglucanes polym $\acute$ ris $\acute$ s avec un colorant azurine.

Dans un mode pr $\acute$ f $\acute$ r $\acute$  de r $\acute$ alisation de la pr $\acute$ sente invention, le r $\acute$ actif se pr $\acute$ sente sous une forme solide.

Avantageusement, pour faciliter la mise en solution de l'enzyme on peut ajouter au substrat contenant l'agent chromophore un tensioactif. Ce tensioactif est choisi notamment parmi le laurylsulfate de sodium ou le dod $\acute$ cylsulfate de sodium.

Selon un meilleur moyen de mise en oeuvre de l'invention la mesure est r $\acute$ alis $\acute$  en quatre  $\acute$ tapes :

- introduction dans le r $\acute$ cipeint (1) de 10 ml d' $\acute$ chantillon dont on veut mesurer l'activit $\acute$  enzymatique, pour un  $\acute$ chantillon solide, il faut remplir de solide jusqu' $\grave$ a la graduation 10 ml ;
- introduction du r $\acute$ actif sous la forme d'une bille solide ;
- introduction du tampon sp $\acute$ cifique jusqu' $\grave$ a la graduation 20 ml ;

- après fermeture de la colonne avec le bouchon, cette dernière est agitée vigoureusement à plusieurs reprises ;

On peut éventuellement ajouter une étape supplémentaire de séparation de la phase liquide et de la phase solide (par centrifugation ou filtration) pour récupérer la phase liquide et mesurer l'intensité de la coloration par spectrophotométrie ou simplement par comparaison avec une échelle colorée.

---

L'apparition d'une coloration bleue après un temps de réaction de 4 à 8 heures confirme la présence d'enzymes actives, l'intensité de la coloration est proportionnelle à l'activité des enzymes présentes dans l'échantillon.

10 Un autre avantage de la présente invention est de pouvoir effectuer une mesure semi-quantitative de l'activité enzymatique. La phase liquide colorée de la colonne peut être récupérée par coupure de l'excroissance sécable de la colonne. L'intensité de sa coloration peut alors être comparée avec une courbe d'étalonnage de DO.

15 En plus d'être rapide, la méthode de mesure est très simple et le dispositif peut être utilisé n'importe où sans nécessiter d'équipement spécial. Par exemple, un fabricant ou un éleveur peut faire une mesure de contrôle dès la fabrication de l'aliment.

20 La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples suivants qui ne doivent pas être considérés comme limitatifs de l'invention.

#### Exemples

Deux séries d'essais ont été menées sur du Rovabio xylan LC (mélange de xylanase et bêta glucanase de *Penicillium funiculosum*) et sur du Rovabio xylanase

TRLC (xylanase de *Trichoderma reesei*) dont l'activité xylanase est comprise entre 350 et 550 uAXC /ml. On estime que le traitement de pulvérisation de la composition liquide sur les aliments conduit à un taux de 70 à 110 uAXC/kg d'aliment.

5 Le tampon utilisé est le tampon acétate maintenant un pH à 4.7. La pulvérisation peut être effectuée sur l'aliment pulvérulent ou sous forme granulé.

échantillon	Activité (avant ajustement)	observation à 3 heures	D.O. à 590 nm à 4h30	D.O. à 590 nm à 8h	observation à 8h
xylanase TRLC sur granulés	1336	bleu : +++	>3,0	>3,0	bleu : +++
xylanase TRLC sur granulés	886,7	bleu : +	1,567	2,685	bleu : ++
xylanase TRLC sur granulés	1469,25	bleu : +	1,429	2,652	bleu : ++
xylanase poudre avant granulation	631,4	pas de coloration	0,201	0,666	bleu : +
xylanase LC sur granulés	1144	bleu : +++	2,309	2,376	bleu : +++
xylanase LC sur granulés	1386,7	bleu : +	1,382	2,484	bleu : +++
xylanase LC sur granulés	1450,5	bleu : +++	2,872	2,85	bleu : +++
xylanase LC sur granulés	1330,5	bleu : ++	1,233	2,096	bleu : +++

### REVENDICATIONS

- 1 - Dispositif de mesure d'activité enzymatique d'un échantillon alimentaire solide caractérisé en ce qu'il comprend un récipient destiné à contenir l'échantillon à tester, un réactif propre à l'enzyme dont on veut mesurer l'activité et un tampon  
5 permettant la mise en solution de ladite enzyme.

---

- 2 - Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'échantillon à tester est un aliment solide de préférence non traité.

- 3 - Dispositif selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit récipient est un tube ou une colonne graduée à usage unique munie d'un système  
10 d'ouverture et de fermeture étanche.

- 4 - Dispositif selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit récipient comporte une excroissance sécable à sa base permettant l'écoulement de la partie liquide de son contenu.

- 5 - Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé  
15 en ce que le réactif est le substrat de l'enzyme lié à un chromophore.

- 6 - Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le réactif se présente sous forme solide ou liquide.

- 7 - Dispositif selon la revendication 1, caractérisée en ce que le tampon utilisé pour mesurer l'activité de l'enzyme est choisi parmi les tampons acide  
20 acétique/acétate de sodium; chlorhydrate de glycine/glycine; acide aconitique/hydroxyde de sodium; acide formique/formate de sodium.

- 8 - Utilisation du dispositif selon la revendication 1 pour mesurer l'activité enzymatique quantitativement caractérisé en ce qu'on compare la coloration obtenue avec une courbe étalon.

- 9 - Procédé de mesure de l'activité enzymatique d'un aliment caractérisé en ce que on introduit dans le dispositif selon les revendications 1 à 5, 10 ml d'échantillon dont on veut mesurer l'activité enzymatique, on introduit du réactif sous la forme d'une bille solide ; on introduit du tampon spécifique jusqu'à la graduation 20 ml ; après fermeture de la colonne avec le bouchon, cette dernière est agitée vigoureusement à plusieurs reprises ; on sépare la phase liquide de la phase solide, on récupère la phase liquide et on mesure l'intensité de la coloration par comparaison avec une échelle colorée.

**ORIGINAL**

1/2

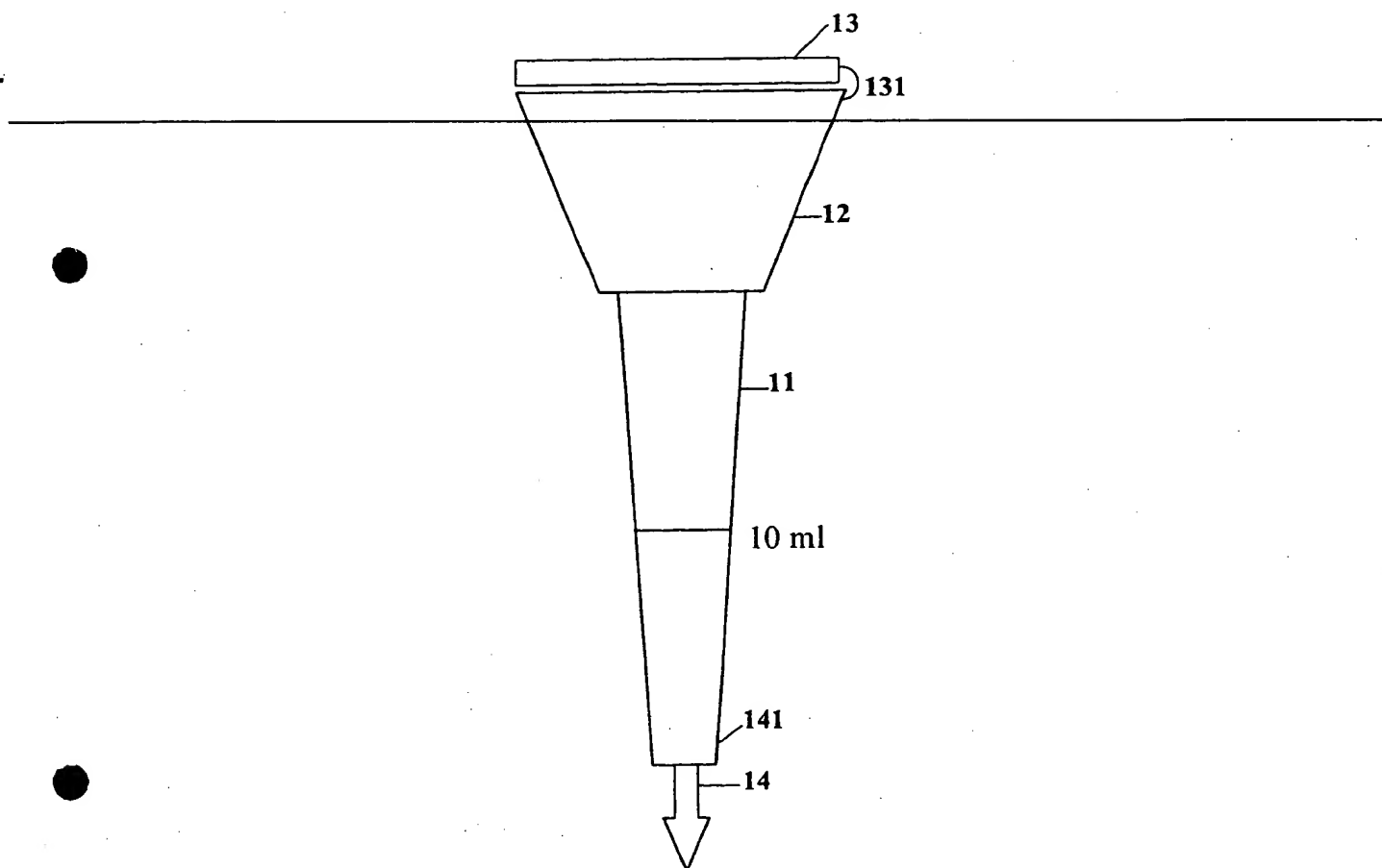


Figure 1

Colonne du dispositif de mesure de l'activité enzymatique

**ORIGINAL**

2/2

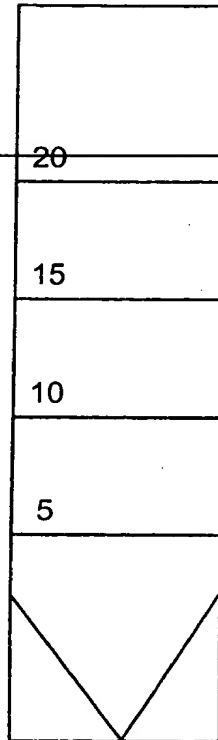


Figure 2

**ORIGINAL**